

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-47166

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>C 07 D 207/444  
A 61 K 31/40  
C 07 D 207/335

識別記号

ADY

庁内整理番号

7019-4C  
7475-4C  
7019-4C

④ 公開 平成3年(1991)2月28日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑯ 発明の名称 エイズウイルスの増殖抑制剤

⑰ 特 願 平1-190326

⑱ 出 願 平1(1989)7月21日

特許法第30条第1項適用 平成元年7月20日、発行の毎日新聞に発表

優先権主張 ⑲ 平1(1989)4月11日 ⑳ 日本(JP)㉑ 特願 平1-91179

㉒ 発 明 者 中 上 辰 芳 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 日本ハム株式会社内

㉓ 発 明 者 大 竹 徹 奈良県北葛城郡香芝町関屋北7丁目22番26号

㉔ 発 明 者 山 崎 暢 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 日本ハム株式会社内

㉕ 出 願 人 日本ハム株式会社 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号

㉖ 代 理 人 弁理士 廣瀬 孝美  
最終頁に続く

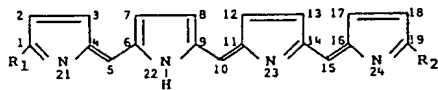
## 明 細 書

## 1. 発明の名称

エイズウイルスの増殖抑制剤

## 2. 特許請求の範囲

1. 下記構造式で示される基本構造を有し、該構造式の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とするエイズウイルスの増殖抑制剤。



(式中、R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>は、それぞれ水酸基又は置換された水酸基を示す)

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明はエイズウイルスの増殖抑制剤に関し、より詳細には、テトラピロール誘導体を有効成分とするエイズウイルスの増殖抑制剤に関する。

〔従来の技術及び発明が解決しようとする課題〕

エイズ(AIDS、後天性免疫不全症候群)は1970年後半から流行し注目され始めた新しい病気で、エイズウイルスに起因する予後不良の免疫不全症である。エイズウイルスはHTLV-III(Human T-cell Leukemia Virus-III)とも称されるが、現在ではHIV(Human Immunodeficiency Virus)と表現されている。このウイルスはヒトレトロウイルスに属し、このウイルスに感染するとリンパ球のヘルパーT細胞が特異的に障害を受け、免疫応答能が破壊される結果、真菌、ウイルス、細菌などによる日和見感染、肉腫等が発生し、70%以上の高死亡率を招くことが知られている。

現段階でのエイズ治療剤としては、以下に示すようなものが知られている。すなわち、

## (1) HIV増殖抑制剤

① HIVの逆転写酵素(RT)阻害剤

② RT阻害によらないもの(HIVの生体付着阻害など)

## (2) 免疫増強剤

## (3) 日和見感染治療剤

である。

これらの治療剤は一応の効果は認められているようであるが、それぞれが種々の問題点を有しており、完全な薬剤とはいえないのが現状である。例えば、HIV増殖抑制剤であるRT阻害剤（例えば、3'-アジド-2'-デオキシチミジン、スミラン、2', 3'-ジデオキシチミジン等）は骨髄機能抑制などの副作用が強く、またRT阻害によらないものは発症予防効果は認められるが治療的效果があまり期待できない。免疫増強剤（例えば、シクロスポリン等）は、ウイルスの感染をかえって広げる場合があり、日和見感染治療剤は、あくまでも対処療法的に用いて延命をはかるためのものと位置づけられている。

将来的に最も期待される薬剤として、有効なワクチンの確立が挙げられるが、HIVの特性として、抗原性が多機に変化するという難題があり、まだ、しばらくは基礎研究を要する分野である。エイズに対して完全な予防・治療剤の存在しない現時点では、上記の種々のタイプの治療剤を組み

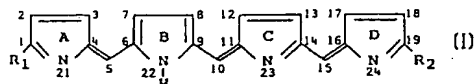
合わせることによって治療が行われている。

このように、従来の技術においては、エイズに対する感染の予防と共に、より効果的で、しかも副作用の少ないエイズ治療剤が未だ発見されていないという問題があり、これを解決することが緊急の課題となっている。

本発明は上記の課題に鑑みて創案されたもので、本発明者らが種々の検討を重ねた結果、特定のテトラピロール誘導体がHIV及びHIV感染細胞の増殖を抑制し得ることを見出して完成したもので、本発明はエイズウイルスの増殖抑制剤を提供することを目的とする。

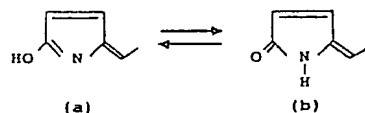
〔課題を解決するための手段〕

上記の課題を解決するためになされた本発明のエイズウイルスの増殖抑制剤は、下記構造式(I)で示される基本構造を有し、該構造式(I)の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容される塩を有効成分とするものである。



(式中、 $R_1$  及び  $R_2$  は、それぞれ水酸基又は置換された水酸基を示す)

上記構造式(I)においては、便宜上、左側の環より順にA～Dの記号を付した。また、構造式(I)の両端のA環及びD環において、基 $R_1$  及び/又は $R_2$  が水酸基の場合、該環は下記部分構造式(a)及び(b)で示されるエノール-ケトの互変異性をとることは当業者に広く知られている。



本明細書においては、このような互変異性体を、便宜上、部分構造式(a)で表すものとする。

本発明のエイズウイルスの増殖抑制剤の有効成分は、上記の構造式(I)で表される基本構造を有し、該式の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換基を有していてもよいテトラピロール誘導体又はその薬理学的に許容され

る塩である。薬理学的に許容される塩としては、アルカリ金属塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（マグネシウム塩、カルシウム塩など）のような無機金属塩、アンモニウム塩、有機塩基塩（例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩など）、有機酸塩（例えば、ギ酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩など）、無機酸塩（例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩など）等が挙げられる。

また、構造式(I)の2位、3位、7位、8位、12位、13位、17位及び18位に置換し得る基としては種々の置換基が挙げられるが、好適には、例えば、低級アルキル基（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、第三級ブチル、ペンチル、ヘキシルなど）、アルケニル基（例えば、ビニル、アリル、1-プロペニル、3-ブテニル、4-ペンテニル、5-ヘキセニル、フィチル、ファーネシルなど）、カルボキシアル

キル基及びエステル化されたカルボキシアルキル基（例えば、カルボキシメチル、カルボキシエチル、メトキシカルボニルメチル、エトキシカルボニルエチル、グルクロニドカルボニルエチルなど）等が挙げられる。

R<sub>1</sub>及びR<sub>2</sub>の置換された水酸基としては、例えば、アシルオキシ基（例えば、アセトキシ、プロピオニルオキシ、ベンゾイルオキシなど）、アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、第三級ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなど）等が挙げられる。

本発明の増殖抑制剤の有効成分であるテトラピロール誘導体は、胆汁色素等の天然成分から採取することができ、また人工的に合成されたものでもよい。特に好適な化合物としては、ビリベルジン（以下、VNという）が挙げられ、VNは作用に優れると共に正常代謝産物であり副作用も少ない。

本発明の増殖抑制剤において、有効成分の投与

酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。また、必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤等の慣用の添加剤を適宜添加することができる。より具体的には、経口製剤とする場合には、例えば、有効成分を非イオン系界面活性剤のような分散剤を用いて懸濁液とし、糖、糖アルコール、無水ケイ酸、非イオン界面活性剤等のような崩壊剤を添加した後、凍結乾燥して粉末化し、常法に準じて、任意の剤形（例えば、カプセル、散剤、粗粒剤、顆粒剤、錠剤、液剤等）に製剤化することにより得られ、また特開昭60-208910号公報、特開昭61-27965号公報等に記載のリボソーム化法を用いれば、リボソーム製剤とすることができる。また、静注製剤とする場合には、有効成分を、例えば、界面活性剤による乳化、シクロデキストリンによる包接化、リボソーム化、脂肪乳化化等の慣用の手段を用いて製剤化することにより得られる。

〔発明の作用・効果〕

量、患者の年齢、体重、症状、疾患の程度、投与経路、投与スケジュール、製剤形態等により、適宜選択・決定されるが、例えば、経口投与の場合、一般に1日当り1～300mg/kg体重程度とされる。

本発明の増殖抑制剤は、経口投与又は非経口投与のいずれも採用することができる。投与に際しては、有効成分を経口投与、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができる。このような製剤としては、例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤等が挙げられ、これらの製剤は製剤上の常套手段により調製することができる。上記の医薬用無毒性担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ

本発明の増殖抑制剤の有効成分である前記テトラピロール誘導体は、HIV及びHIVに感染した細胞の増殖を特異的に抑制する効果を有する。従って、当該テトラピロール誘導体を有効成分として含有する本発明の増殖抑制剤は、エイズの予防、治療等に極めて有用である。

〔実施例〕

以下、実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例1

VN(20g)を5V/V%ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール水溶液50mlに懸濁し、ガラスビーズを用いて湿式粉碎を行った。次いで、得られた粉碎液50mlにショ糖脂肪酸エステル30gを加え、ドライアイス・メタノール浴で凍結後、乾燥して凍結乾燥製剤を調製した。

実施例2

VN(1.8mg)を12.5%(V/V)ジメチルβ型シクロデキストリンを含むウィテブソルW-

35 坐剤用基剤(45 mg)に加熱分散した後、常法により坐剤を調製した。

#### 試験例 1

##### HIV 感染細胞増殖抑制作用試験

HIV 感染細胞に対する本発明増殖抑制剤の有効成分の効果を調べるために、HIV に感染した MT-4 細胞を用いて試験した。試験の原理、方法及び結果は以下のとおりである。

##### (1) 原理

ヒト T 細胞白血病の原因ウイルスである HTLV-I (ATLV) が持続感染している T 細胞株である MT-4 細胞に HIV を感染させると急速に HIV が増殖し、MT-4 細胞は細胞障害のために 5~6 日で死滅することが知られている。したがって、MT-4 細胞の細胞障害をマーカーとして薬剤の抗 HIV 効果を判定することができる。

##### (2) 方法及び結果

MT-4 細胞に HIV (LAV 株) を 0.001 TCID<sub>50</sub>/cell となるように 37℃ で 1 時間感染させた後洗浄し、感染細胞を調製した。種々の濃度

の VN を含む RPMI-1640 培地(牛胎児血清を 10% 含む)に、上記感染細胞を  $1 \times 10^5$  cell/ml 濃度で浮遊させた。この細胞浮遊液を 24 穴のカルチャープレートに 1 ml/ウェル量入れ、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 5 日間培養した。また、HIV 非感染 MT-4 細胞も同様に VN を含む培地で培養した。培養後、ウイルス増殖による細胞障害効果(CPE)の観察を行い、MT-4 細胞の生存数をトリパンブルー染色法により読み取った。検体の HIV 増殖抑制作用は、下記式から算出される細胞障害抑制率(%)を指標として評価した。

細胞障害抑制率(%) =

$$\frac{\text{HIV 感染 MT-4 細胞の生細胞数}}{\text{非感染 MT-4 細胞の生細胞数}} \times 100$$

得られた結果を下記第 1 表に示した。

第 1 表

VN の濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0	2.5	7.4	22.2	66.7
細胞障害抑制率 (%)	6	6	5	87	124

第 1 表から明らかなように、VN は 22.2 ~ 66.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度で 80% 以上の細胞障害抑制率を示し、HIV の増殖を強く抑制することが判明した。

なお、対照試験例として、VN の代りに Protoporphyrin IX Disodium Salt (PPN) を用いて同様な試験を行ったが、PPN は 31.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下の濃度では効果が全く認められず、また 66.7 ~ 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では判定不能であった。

#### 試験例 2

##### 巨細胞形成抑制作用試験

本発明増殖抑制剤の有効成分の巨細胞形成抑制作用を試験した。試験の原理、方法及び結果は以下のとおりである。

##### (1) 原理

MOLT-4 細胞と HIV に持続感染している MOLT-4 細胞(以下、MOLT-4/HIV 細胞という)を混合すると 1~2 日間で巨細胞が形成される。この現象は MOLT-4 細胞表面の CD4 レセプターと MOLT-4/HIV 細胞表

面に発現されている HIV のエンベロープ蛋白である gp120 が結合して起こるものと考えられている。この実験では薬剤が HIV と CD4 分子の結合(HIV のリンパ球への吸着)を抑制する効果を試験することができる。

##### (2) 方法

MOLT-4 細胞と HIV に持続感染している MOLT-4/HIV 細胞を、種々の濃度の VN を含む RPMI-1640 培地中で 1:1 の割合で混合し(細胞濃度は  $5 \times 10^5$  cell/ml)、24 穴のカルチャープレートに 1 ml/ウェル量入れ、試験例 1 における条件と同じ条件下で 24 時間培養した。培養後、顕鏡にて巨細胞形成の有無を観察した。

##### (3) 結果

VN は 67  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及び 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で巨細胞形成を 100% 抑制した。このことから、VN は HIV と細胞の結合を抑制する作用を持つことが判明した。

第1頁の続き

⑫発明者	太治	司郎	大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 日本ハム株式会社内
⑫発明者	森	治代	奈良県宇陀郡榛原町あかね台1丁目2番の12
⑫発明者	上羽	昇	奈良県大和郡山市泉原町81-10
⑫発明者	國田	信治	大阪府吹田市藤代台4-20-15
⑫発明者	金井	素子	大阪府枚方市茄子作1丁目41-17